

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-169521

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

A 61 K 37/02

識別記号

ABB  
ABC

庁内整理番号

8615-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)6月29日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑮ 発明の名称 自己免疫疾患治療剤

⑯ 特 願 昭63-324856

⑰ 出 願 昭63(1988)12月22日

⑱ 発 明 者 滝 伸 介 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央  
研究所内  
⑲ 発 明 者 高 村 俊 朗 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央  
研究所内  
⑳ 発 明 者 高 原 義 之 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央  
研究所内  
㉑ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 細 書

1. 発明の名称

自己免疫疾患治療剤

2. 特許請求の範囲

1) ジフテリア毒素A断片を結合させたヒトインターロイキン2を有効成分とする自己免疫疾患治療剤。

2) 自己免疫疾患が慢性関節リウマチ又は全身性紅斑狼瘡である特許請求の範囲第1項記載の治療剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は慢性関節リウマチ及び全身性紅斑狼瘡(以下SLEと略する)等の自己免疫疾患治療剤に関する。

更に詳細にはジフテリア毒素A断片とヒトインターロイキン2を結合した複合体を有効成分とする自己免疫疾患用治療剤に関する。

(従来技術)

自己免疫疾患は自己成分に対する免疫応答が引

き金となって起こる一連の炎症反応である。本疾患に対する治療法としては抗炎症剤、免疫抑制剤、または免疫調整剤が投与されている。しかしながら抗炎症剤たとえば副腎皮質ホルモン製剤などは炎症反応のみを抑制するものであり、原因となっている自己免疫反応自体を抑制するものではないために薬物の投与を中止すれば症状が再燃する場合がある。また免疫抑制剤、たとえばシクロヘキシミドなどは免疫系にのみ特異的に働くのではなく、他の細胞を含む多くの臓器に対しても作用し、この副作用のために投与を中止せざるを得ない場合がある。この点について、現在用いられている抗炎症剤、免疫調整剤例えば抗リウマチ薬として知られるCCAや金製剤などもまた同様である。この原因として免疫抑制剤、免疫調整剤ともに免疫担当細胞の一部を除去失活せしめるものであるが、その作用の特異性が低く、多かれ少なかれ免疫担当細胞とそれ以外の細胞に共通した性質をそれら薬剤の選択毒性の標的として利用しているからである。

以上のことより、自己免疫疾患の治療薬として望まれる性質は、原因となっている自己免疫応答を抑制し、又、免疫担当細胞にのみ特異的に働くものであることが望ましい。然しながら現在これらの条件を満たす治療薬は存在しない。

(本発明が解決しようとする課題)

自己免疫応答を抑制し、又免疫担当細胞にのみ特異的に作用する治療薬の提供である。

(課題を解決する為の手段)

本発明者等は上記課題を解決する為に種々の薬剤を検討した結果、ヒトインターロイキン2とジフテリア毒素のA断片を結合した複合体がこの条件にあてはまるものであることを見出し、本発明を完成させた。

即ち、本発明はジフテリア毒素A断片を結合させたヒトインターロイキン2を有効成分とする自己免疫疾患治療薬である。

さてヒトインターロイキン2 (以下IL-2と略す) は免疫応答に必須なメディエータ、いわゆるリンホカインの一種であり、Tリンパ球から放

出される因子であり、そのアミノ酸配列及び遺伝子のDNA配列は既に決定されている(文献谷口ら、ネイチャー、1983年、第302巻、305ページ)。

このIL-2は、抗原によって刺激をうけIL-2受容体をもその細胞表面に発現するようになった免疫担当細胞、すなわちT細胞やB細胞に対してのみ作用する。自己免疫疾患、たとえば慢性関節リウマチやSLEにおいてその関節滑液や血液中に可溶性IL-2受容体が存在することが報告されている(Symonsら、ジャーナル・オブ・イムノロジー、第141巻、2612ページ、1988年など)。可溶性IL-2受容体はIL-2受容体を発現している細胞から放出されていることが知られており(Rubinら、ジャーナル・オブ・イムノロジー、第135巻、3172ページ、1985年)、従って、自己免疫疾患にはIL-2受容体を発現しているリンパ球が存在していると考えられる。

さらに我々は、SLEモデルマウスであるNZB×NZW F<sub>1</sub>マウスにおいて、その脾臓B細胞はIL-2に対して高い応答性を示すが、

それはB細胞が自発的にIL-2受容体を発現しているためであることを発見した(長谷川ら、日本免疫学会総会記録、第18巻、396ページ、1988年)。以上より、我々はIL-2受容体を発現しているリンパ球が自己免疫疾患の発症と密接に関係していることを見出した。自己免疫疾患におけるIL-2受容体発現細胞の重要性はこれまで看過されて来たものである(Miyasakaら、クリニカル・イムノロジー・アンド・イムノパソロジー、第31巻、109ページ、1984年など)。

このことから我々はIL-2受容体を発現するリンパ球を効率的に除去することができれば自己免疫疾患の原因となる自己成分に対する免疫応答を抑制できると考え、本目的のためにジフテリア毒素A断片とIL-2の複合体に注目したわけである。

ジフテリア毒素は、A、B 2つの断片に分けられ、後者は様々な細胞の表面に存在するジフテリア毒素受容体に結合する部分であり、前者は細胞内に侵入後B断片と切り離され、毒性を発揮する

部分である。従ってジフテリア毒素のA断片のみでは細胞に結合することができず、従って毒性を発揮できない。この性質を利用して、例えばインスリンや上皮細胞増殖因子などにA断片のみを結合させ、インスリンや上皮細胞成長因子に対する受容体を発現している細胞のみで特異的に障害する方法が一般に知られている(清水、ジュネティクス アナリシス オブ ザ セル・サーフェス 1984, P. グッドフェロー編、チャプマン・アンド・ホール社、ニューヨーク)。

最近、IL-2およびジフテリア毒素A断片のそれぞれの相補DNAを結合させたものを大腸菌内で発現させ、IL-2とジフテリア毒素A断片の融合蛋白を産生させる方法が開発された(ウィリアムら、プロテイン・エンジニアリング、1巻、493ページ、1987年)。我々は同様な方法で作成し、抗IL-2抗体を結合した吸着剤にて精製したIL-2・ジフテリア毒素A断片複合体をJ.R. Murphy (ボストン大学)より入手し、自己免疫疾患モデルマウスに投与し、その発症を抑制するこ

とができた。

従ってこの複合体は自己免疫疾患の治療剤として、有用であると判断される。

因みに本複合体はジフテリア毒素A断片の相補DNAとIL-2相補DNAを結合させ、適当な発現ベクターに挿入したものを導入した細菌等により製造しても良いし、又ジフテリア毒素A断片蛋白と、IL-2蛋白を例えば2価架橋等を用いて化学的に結合させて製造してもよい。

本発明に係る薬剤の投与の方法としては、1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ないしは1  $\text{mg}/\text{kg}$ 体重量もしくは70  $\mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ のIL-2-ジフテリア毒素A断片複合体を生理的食塩水もしくはリン酸緩衝液中に溶解し、腹腔中もしくは静脈中に1週間に1回以上程度、投与すればよい。また浸透圧ポンプ中にIL-2-ジフテリア毒素A断片複合体を適量置注入し、患者体内に埋め込むことにより徐放的にこれを投与することも有効である。また、この複合体はヒト血清アルブミン等を安定剤として含む溶液中に溶解して投与することもできる。

を1万ユニットとした時の相対値で示してある。第1図および第2図に示すとおり、IL-2-ジフテリア毒素A断片複合体を投与したマウスは著明な生存延長および血清中の抗DNA抗体価の上昇の抑制が見られた。尚血清中の抗DNA抗体は自己免疫疾患の指標となり値が高い程、自己免疫疾患が進行していると考ええる。

(本発明の効果)

本発明のIL-2-ジフテリア毒素A断片複合体は従来有効な治療法がなかった慢性関節リウマチ、SLE等の自己免疫疾患の治療剤となり得る。

#### 4. 図面の簡単な説明

第一図はIL-2-ジフテリア毒素A断片複合体もしくはジフテリア毒素A断片投与NZB  $\times$  NZM雑種第1代マウスの生存率を時間経過に従って示したものである。

第二図は各月に採血した血液中の抗DNA抗体価の経時変化を示すものである。各点はその時点で生存しているマウスの平均値を要す。

本発明の薬剤は安全性が確認されている。

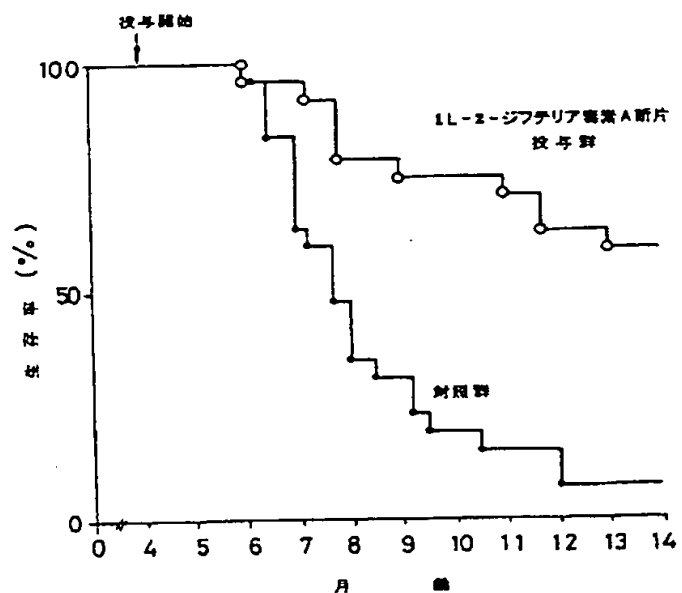
また、本発明の薬剤は自己免疫疾患全般に有効であるが、とりわけ慢性関節リウマチ、SLEに特に有効である。

以上本発明を実施例に従って解説するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

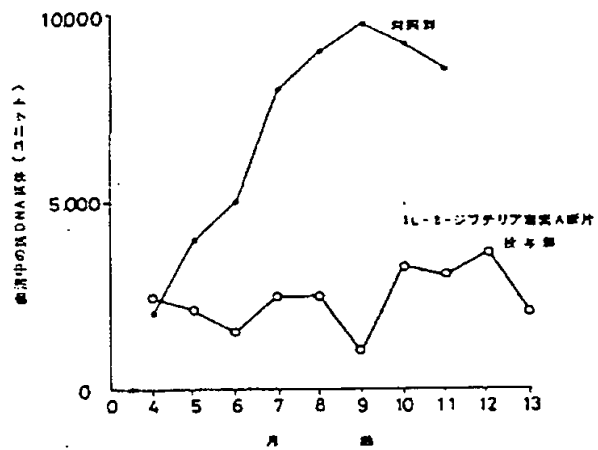
#### 実施例1 紅斑狼瘡モデルマウスの生存期間の延長および抗DNA自己抗体産生抑制

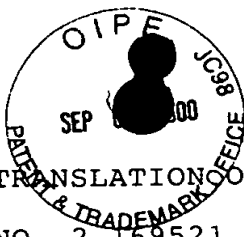
一群25匹のNZB  $\times$  NZW雑種第一代マウス(チャールズ・リバー・ジャパン)に対し、IL-2-ジフテリア毒素A断片50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重もしくは、ジフテリア毒素A断片50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を毎週1回、投与した。投与は4ヶ月齢から始めた。毎月、生存しているマウスの数を数え更に月1回眼底静脈より少量の血液を採取し、血清を得た。得られた血清の抗DNA抗体価を一般に用いられる方法によりELISA法を用いて測定した(例えば、緒井、生体の科学第38巻5号、515ページ参照)。抗体価は標準サンプルであるM $\phi$ L $\cdot$ Hp-1pr/1prマウス血清に含まれる抗DNA抗体価

第1図



第 2 図





PARTIAL TRANSLATION OF JAPANESE UNEXAMINED PATENT PUBLICATION  
(KOKAI) NO. 2-169521 (Publication 1)

Title of the Invention: Therapeutic Agent for Autoimmune  
Disease

Publication Date: June 29, 1990

Patent Application No.: 63-324856

Filing Date: December 22, 1988

Applicants: Ajinomoto KK.

Priority Claimed: None

1. Title of the Invention

Therapeutic Agent for Autoimmune Disease

2. Claim

(1) A therapeutic agent for autoimmune disease  
containing as an active ingredient human interleukin-2  
jointed to diphtheria toxin A fragment.

(2) The therapeutic agent according to claim 1  
wherein said autoimmune disease is rheumatoid arthritis or  
systemic lupus erythematosus.

3. Detailed Description of the Invention

[Field of Industrial Applicability]

The present invention relates to a therapeutic  
agent for an autoimmune disease such as rheumatoid arthritis  
and systemic lupus erythematosus. (SLE).

More specifically, it relates to a therapeutic  
agent for an autoimmune disease containing as an active  
ingredient a complex of human interleukin-2 (IL-2) with  
diphtheria toxin A fragment.

[Problems to be solved by the Invention]

The present invention provides a therapeutic agent which suppresses an autoimmune response or acts specifically on the immunocompetent cells.

[Means for Solving the Problems]

As a result of research into various agents, the present inventors have discovered that a complex of human interleukin-2 joined to diphtheria toxin A fragment can solve the above-mentioned problems.

In other words, the present invention relates to a therapeutic agent for an autoimmune disease containing as an active ingredient a complex of human interleukin-2 (IL-2) with diphtheria toxin A fragment.

Human IL-2 is a kind of mediator essential to the immune response in the human body, i.e., lymphokines, and a factor which is released from T lymphocytes. Its amino acid sequence and DNA sequence have already been determined (see Yaniguchi et al., Nature, 1983, Vol. 302, pp. 305).

Human IL-2 acts only on the immunocompetent cells which became to express IL-2 receptor on cell surface by stimulation with the autoantigen.

We discovered that the reason why the splenocytes from NZB  $\times$  NZW F<sub>1</sub> SLE model mice show a high response to IL-2 is the spontaneous expression of IL-2 receptor on the surface of B cells. Therefore, we discovered that IL-2 receptor-expressing lymphocytes are associated with a development of autoimmune disease. The importance of IL-2 receptor-expressing cells has been overlooked to date (Miyasaka et al., Clinical Immunology and Immunopathology, Vol. 31, pp. 109, 1984, etc.).

We focused on that if IL-2-expressing lymphocytes can be effectively removed, an immune response to an autoantigen which is responsible for autoimmunity can be suppressed.

Diphtheria toxin A fragment exerts toxicity on cells when it is cleaved from B fragment upon insertion into cells. Therefore, the A fragment alone cannot bind to cells and thus exert toxicity. By using this property, the methods wherein the A fragment alone is joined to insulin or epithelial cell growth factors (EGFs) etc., to injure only the insulin- or EGF-expressing cell, are well known (Shimizu, Genetic Analysis of the Cell Surface, ed. P. Goodfellow, Chapman & Hall Company, New York, 1984).

Recently, the method wherein the complementary DNAs each coding for IL-2 and diphtheria toxin A are joined together, the joined DNAs are expressed in E. coli cells, and the fused protein consisting of IL-2 and diphtheria toxin A fragment is produced, has been developed (Williams, et al., Protein Engineering, Vol. 1, pp. 493, 1987). When the IL-2-diphtheria toxin A fragment complex (obtained from Dr. Murphy, Boston University) prepared by a method similar to the above and purified with an anti-IL-2 antibody adsorbent is administered to autoimmune disease model mice, the development of the disease can be suppressed. Therefore, this complex is useful as a therapeutic agent for autoimmune disease.

A method for administration of the agent of the present invention is by dissolving 1  $\mu$ g - 1 mg/kg body weight, preferably 70  $\mu$ g - 100  $\mu$ g/kg body weight of IL-2 into a physiological saline or phosphate buffered saline, and administering once or more per week intraperitoneally or intravenously. Alternatively, by implanting an osmotic pump containing a suitable amount of the above complex agent, the pump can continue releasing the agent. Further, a solution



containing this complex agent and a human serum albumin as a stabilizer can be administered.

The agent of the present invention is particularly useful for rheumatoid arthritis and SLE, although it is useful for all autoimmune diseases.

[Examples]

Example 1: The extended lifetime and the suppressed anti-DNA autoantibody production in SLE model mice

To a group consisting of twenty-five NZB × NZW hybrid F<sub>1</sub> mice, 50 µg/kg body weight of IL-2-diphtheria toxin A fragment complex or 50 µg/kg body weight of diphtheria toxin A fragment alone was administered once per week. The administration was started at the age of four months. Every month, the number of living mice was counted and a small amount of blood was collected from a vein and the serum was obtained therefrom. Anti-DNA antibody titer of the resulting serum was determined using the conventional ELISA method. The antibody titers are expressed in values relative to the anti-DNA antibody titer value of a control serum sample from a MRL.Mp-1pr/1pr mouse regarded as 10,000 units. As seen from Figs. 1 and 2, substantial degrees of the extension of lifetime and the suppression of increase in the anti-DNA antibody titer, were observed in the mice wherein IL-2-diphtheria toxin A fragment complex were administered.

[Effects of the Invention]

The IL-2-diphtheria toxin A fragment complex can be a therapeutic agent for autoimmune disease such as rheumatoid arthritis and SLE where no effective therapeutic method has existed before.

Fig. 1

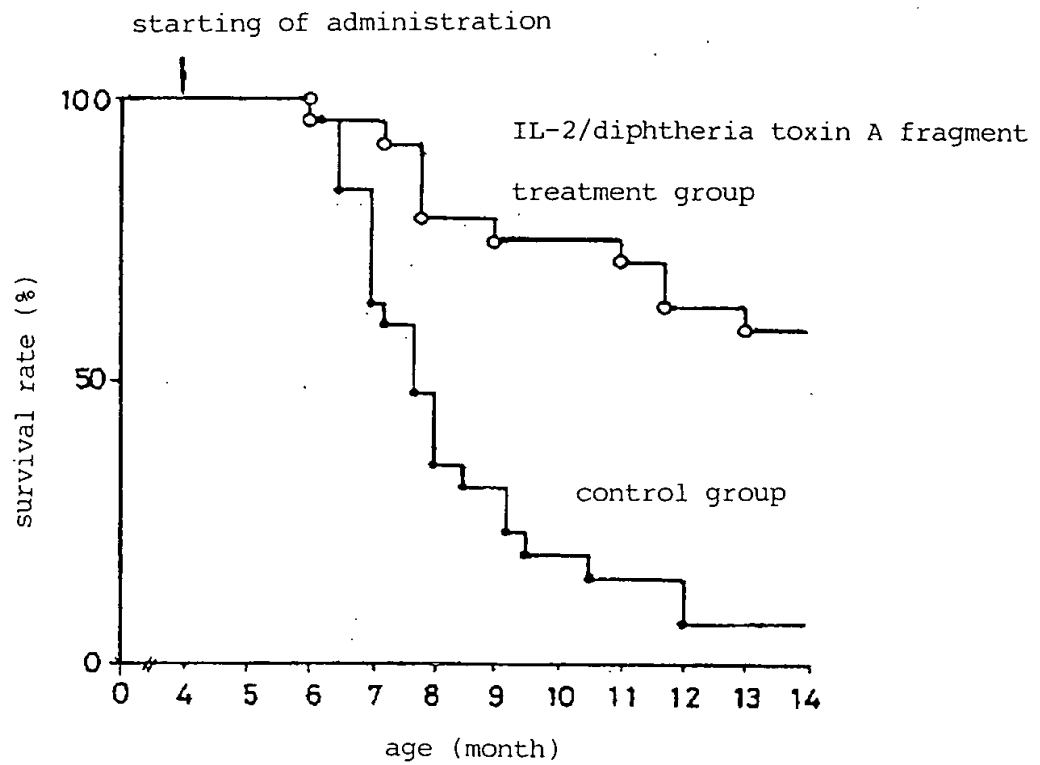


Fig. 2

